



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 96/40989</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 19 décembre 1996 (19.12.96)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/00836 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 3 juin 1996 (03.06.96) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 08/485,133 7 juin 1995 (07.06.95) US <b>(71) Déposant:</b> BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). <b>(72) Inventeurs:</b> ALLIBERT, Patrice, André; 18, les Granges, F-69290 Grézieu-la-Varenne (FR). CROS, Philippe; 90, rue du Commandant-Charcot, F-69005 Lyon (FR). MACH, Bernard, François; 45, route de Prégny, CH-1292 Chambésy (CH). MANDRAND, Bernard, Fabien; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). TIERCY, Jean-Marie; 6, avenue Gasparin, CH-1224 Chêne-Bougeries (CH). <b>(74) Mandataire:</b> TONNELIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AU, CA, CN, IL, JP, KR, NO, NZ, PL, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
<b>(54) Title:</b> SYSTEM OF PROBES INTENDED TO CARRY OUT THE TYPING HLA DR, AND TYPING PROCESS USING SAID PROBES <b>(54) Titre:</b> SYSTEME DE SONDAS PERMETTANT D'EFFECTUER LE TYPAGE HLA DR, ET PROCEDE DE TYPAGE UTILISANT LESDITES SONDAS <b>(57) Abstract</b> Nucleotidic probe selected amongst the following: TGGCAGCTTAAGTTT, CCTAAGAGGGAGTG, GCGAGTGTGGAACCT, AAGACAGGCGGGC, or their complementary ones. Said probes may be used to carry out the typing HLA DR of a person, particularly before the transplantation of organs. <b>(57) Abrégé</b> Sonde nucléotidique choisie parmi les suivantes: TGGCAGCTTAAGTTT, CCTAAGAGGGAGTG, GCGAGTGTGGAACCT, AAGACAGGCGGGC, ou leurs complémentaires. Ces sondes peuvent être utilisées pour effectuer le typage HLA DR d'un individu, notamment avant transplantation d'organes.		

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Système de sondes permettant d'effectuer le typage HLA DR, et  
procédé de typage utilisant lesdites sondes.

La présente invention a pour objet un procédé pour déterminer le génotype HLA de classe II d'un individu et se rapporte plus particulièrement à la détection des gènes polymorphes HLA DR. Ce procédé est applicable notamment au typage HLA en transplantation, au diagnostic médical, à la médecine légale, etc.

Le système HLA (antigène des lymphocytes humains) est codé par le complexe d'histocompatibilité majeur chez l'homme. Il constitue une contrainte très importante au cours des transplantations d'organes entre les individus en effectuant une distinction entre le soi et le non-soi. De plus, les facteurs du HLA sont impliqués dans la prédisposition à un grand nombre de maladies. Les antigènes du système HLA ont donc été utilisés dans des procédés de typage pour déterminer les caractéristiques entre donneurs et receveurs lors de transplantations d'organes (F. H. BACH et J.J. VAN ROOD, N. Engl. J. Med., 295, pages 806-13 (1976)), ainsi que la prédisposition d'un individu à certaines maladies.

D'un point de vue génétique, le système HLA est bien caractérisé et consiste en un ensemble de loci plus ou moins polymorphes situés dans un intervalle d'environ 2 centimorgans (cM) sur le bras court du chromosome 6. Trois loci dans ce système (HLA-A, B et C) codent pour une classe d'alloantigènes exprimés de façon codominante (classe I). Une autre région (HLA-D) qui contient en fait plusieurs gènes code pour une seconde classe d'alloantigènes exprimés de façon codominante avec un degré important de polymorphisme (classe II). Plusieurs autres loci qui contrôlent notamment les composants C2, C4 et le facteur Bf de la cascade du complément appartiennent également au système HLA (classe III). Le succès des greffes d'organes dépend dans une grande mesure de l'identité HLA (classes I et II) entre receveur et donneur. En conséquence, le typage HLA doit être le plus exact possible. Ce besoin concerne principalement les transplantations de reins (P.J. Morris et A. Ting (1982) Immunol. Rev 66, 103 - G. Opelz (1989) Transpl. Proc. 21,609 - E.L. LAGAAIJ, P.H. Hennemann, M. Ruigrok et al. (1985) New Engl. J. Med 321,701) et les greffes de moelle osseuse (P.G. Beatty, R.A. Clift, E.M. Mickelson et al. (1985) New Engl. J. Med 313,765 - J.M. Hows et B.A. Bradley (1990) British J. Hematol. 76,1). Dans le cadre de la greffe de moelle osseuse, l'identité parfaite au niveau des antigènes HLA classe II représente un facteur déterminant pour le succès de la greffe, c'est-à-dire

pour éviter un rejet du greffon ou le développement d'une maladie greffon-contre-hôte (P.G. Beatty, J. Hansen, G.M. Longton et al. (1991) Transplantation 51, 443 - R.C. Ash, J.T. Casper, C.R. Chitambar et al. (1990) New Engl. J. Med. 322, 485 - C. Anasetti, D. Amos, P.G. Beatty et al. (1989) New Engl. J. Med. 320,197).

Le polymorphisme des produits d'expression des gènes de la région HLA D est défini habituellement par des techniques sérologiques basées sur l'analyse par des alloantisera des produits des gènes HLA exprimés à la surface des cellules (J.J. Van Rood et A. Van Leeuwen (1963) J. Clin. Invest. 42,1382 - J.J. Van Rood, A. Van Leeuwen, J.J. Koning, A.B. Van Oud Ablas (1975) Tissue Antigens 5, 73). La précision et la reproductibilité dépendent des lots de sera disponibles. Cependant, même dans les meilleures conditions, un très grand nombre des allèles existants ne sont pas détectables par ces techniques sérologiques. Les limites de l'analyse sérologique résultent essentiellement de l'absence d'alloantisera monospécifiques, d'une discrimination incomplète avec des réactivités croisées entre des spécificités très proches, par exemple DR3 et DRw13 ou encore d'une expression altérée des molécules HLA classe II à la surface des cellules, par exemple de cellules leucémiques.

Grâce à la biologie moléculaire, on sait maintenant qu'il existe un plus grand nombre de gènes HLA qu'on ne le supposait auparavant et, surtout, beaucoup plus d'allèles différents. Cette diversité est maintenant caractérisée au niveau des séquences d'ADN des différents gènes et allèles. Selon le dernier rapport du comité de nomenclature HLA (voir The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system (1990) Immunogenetics 31, 131 - and - J.G. Bodmer, S.G.E. Marsh, E.D. Albert, W.F. Bodmer, B. Dupont, H.A. Erlich, B. Mach, W.R. Mayr, P. Parham, T. Sasazuki, G.M.T. Schreuder, J.L. Strominger, A. Svejgaard et P.I. Terasaki (1991) Tissue Antigens 37, 97), le polymorphisme HLA classe II se répartit comme suit : locus DRB1 : 47 allèles, locus DRB3 : 4 allèles, locus DRB4 : 1 allèle, locus DRB5 : 4 allèles, locus DQB1 : 17 allèles, locus DQA1 : 13 allèles, locus DPB1 : 21 allèles, locus DPA1 : 4 allèles.

Beaucoup de ces allèles échappent à l'analyse sérologique et ne sont identifiables qu'au niveau de l'ADN. On peut illustrer les limites du typage sérologique par la spécificité sérologique DR4, maintenant subdivisée en 11 sous-types (DRB1\*0401-0411) (voir J.G. Bodmer, S.G.E. Marsh, E.D. Albert, W.F. Bodmer, B. Dupont, H.A.

Erlich, B. Mach, W.R. Mayr, P. Parham, T. Sasazuki, G.M.T. Schreuder, J.L. Strominger, A. Svejgaard et P.I. Terasaki (1991) Tissue Antigens 37, 97), identifiables seulement au niveau de la séquence d'ADN.

5 De même, la spécificité DRw6, qui peut être subdivisée en DRw13 et DRw14 par quelques alloantisera, contient en réalité 10 séquences alléliques (DRB1\*1301-1305 et DRB1\*1401-1405 (voir la publication de Bodmer JG citée ci-dessus) qui, là aussi, ne peuvent être discriminées que par l'analyse génotypique au niveau de la

10 séquence d'ADN.

L'analyse génotypique est une nouvelle approche permettant d'analyser la diversité du système HLA classe II directement au niveau des gènes. L'analyse génotypique est basée sur le principe de l'hybridation moléculaire et la première approche qui fut proposée

15 est la technique dite "RFLP" qui consiste à fragmenter l'ADN par utilisation d'enzymes de restriction et à analyser la taille des fragments d'ADN spécifiques générés par ces enzymes (voir C.T. Wake, E.O. Long et B. Mach (1982) Nature 300, 372 - J. Bihme, M; Andersson, G. Andersson, E. Miller, P.A. Peterson et L. Rask (1985)

20 J. Immunol. 135, 2149 - J.L. Bidwell, E.A. Bidwell, D.A. Savage, D. Middleton, P.T. Klouda et B.A. Bradley (1988) Transplantation 45, 640).

L'analyse par RFLP ne permet de reconnaître que certaines des différences alléliques indétectables par la sérologie, et cette

25 technique présente encore des limitations. En effet, un allèle portant une séquence différente est identifiable seulement si le nucléotide différent est dans le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction utilisée dans l'analyse et donc un grand nombre d'allèles HLA classe II ne seront pas reconnus par cette analyse. De

30 plus, l'analyse RFLP met rarement en évidence une modification dans une séquence codante, et ne fournit pas d'informations sur la nature exacte de la modification. Enfin, cette technique est longue et lourde car elle implique d'utiliser des quantités relativement importantes d'acides nucléiques qui doivent être digérées avec

35 plusieurs enzymes de restriction, des électrophorèses et des transferts sur filtres.

Pour illustrer les limites de la technique RFLP, on peut mentionner que les sous-types des spécificités DR1, DR4, DRw8, DRw11 ou DRw13, ne sont pas détectables par RFLP.

Une nouvelle technique d'analyse génotypique de HLA classe II a été proposée, qui est la méthode dite "de typage par oligonucléotides". Grâce à la connaissance des séquences d'ADN des gènes de HLA classe II et en particulier des gènes DR $\beta$ , qui sont de loin les plus polymorphes, on peut utiliser des oligonucléotides qui sont spécifiques d'un endroit donné de la séquence du gène comme traceurs pour l'analyse du polymorphisme par hybridation. Ces oligonucléotides sont choisis de façon à être les plus informatifs possibles et à permettre l'identification des différents allèles, sur la base de leurs différences de séquences. Dans la pratique, n'importe quelle différence de séquence, même d'un seul nucléotide, peut être détectée.

La technique de typage par oligonucléotides peut être appliquée aussi bien à l'ADN, comme décrit dans la publication d'Angelini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 83, pages 4489 - 4493 (1986), qu'à l'ARN (voir C. UCLA, J.J. Van Rood, J. Gorski et B. Mach (1987) J. Clin. Invest. 80, 1155).

Cette nouvelle approche est basée sur le principe de l'hybridation moléculaire en utilisant les propriétés caractéristiques des acides nucléiques qui sont les possibilités d'interagir avec une séquence complémentaire par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes et de former ainsi un hybride stable, selon les lois d'appariement connues, c'est-à-dire A-T, G-C, pour l'ADN et A-U, G-C pour l'ARN. Ainsi, des oligonucléotides de synthèse correspondant à des séquences d'ADN ou d'ARN des allèles connus peuvent être utilisés comme sondes pour identifier, dans un échantillon, une séquence nucléique appelée cible, contenant une séquence complémentaire de celle de la sonde. Le marquage de l'hybride formé entre la cible et la sonde permet la détection et la quantification de la cible dans l'échantillon. Ce marquage est effectué par tout marqueur connu, tel que marqueur enzymatique, chimique ou radioactif. Sur la base de ces principes la première application de typage par oligonucléotide pour le HLA classe II a été présentée par Angelini et al. dans la publication précédemment citée, avec utilisation de la technique dite "SOUTHERN" selon laquelle l'ADN cible est déposé sur une membrane de nylon et la détection est effectuée à l'aide d'une sonde oligonucléotidique marquée. La technique a ensuite été appliquée à la détection d'allèles HLA classe II non identifiables par la sérologie de

routine (voir J.M. Tiercy, J. Gorski, M. Jeannet et B. Mach (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 198 - J.M. Tiercy, J. Gorski, H. Bétuel, A.C. Freidel, L. Gebährer, M. Jeannet et B. Mach (1989) Human Immunol. 24, 1). Une autre application directe au typage HLA

5 classe II est celle décrite dans la demande de brevet PCT WO 89/11547 utilisant la technique dite "Dot-Blot". Une modification à ces techniques est représentée par la méthode dite "Reverse Dot Blot" qui consiste à fixer sur une membrane de papier, nitrocellulose ou un mélange des deux, une sonde nucléotidique et à

10 effectuer la détection d'une hybridation avec une cible marquée. Cette technique a été appliquée au typage HLA-DQA et à la détection des mutations de la  $\beta$ -thalassémie méditerranéenne (R.K. Saiki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 86, pages 6230-6234 (1989)).

Comme décrit précédemment et expliqué dans les publications et

15 la demande de brevet citées ci-dessus, le typage cellulaire nécessite la détection de mutations ponctuelles dans le génome et implique la mise au point de sondes suffisamment sensibles pour détecter et différencier des séquences homologues à un nucléotide près, et on a trouvé qu'il fallait utiliser des sondes de courte

20 taille, généralement de moins de 30 nucléotides, qui confèrent au test une grande spécificité, tout en conservant une bonne sensibilité. L'utilisation d'oligonucléotides de courte taille permet de disposer d'un grand éventail de sélectivité.

Dans le cas où l'on utilise un test comprenant la fixation

25 d'une sonde sur un support solide reste posé le problème lié à l'immobilisation d'une sonde courte, inférieure à 30 nucléotides, sur un tel support solide. R.K. SAIKI et al., dans la publication précédemment citée, ont proposé une méthode qui consiste à coupler à l'extrémité 3' d'une sonde comprenant entre 15 et 20 bases, une

30 queue poly(dT) de 400 bases et à immobiliser la sonde par l'intermédiaire de cette queue sur un filtre de nylon par exposition à des rayons ultraviolets, de façon à coupler par covalence les bases thymines aux amines primaires présentes dans le nylon.

Cependant, cette méthode n'est pas entièrement satisfaisante,

35 car elle présente des problèmes de spécificité. En effet, les bases thymines de la sonde peuvent également réagir, sous rayonnement U.V., avec le support, ce qui implique une diminution de l'efficacité d'hybridation.

Par ailleurs, pour des raisons d'industrialisation, il est

souhaitable de mettre au point un procédé de typage qui présente une grande spécificité et une bonne sensibilité, mais qui de plus soit simple à mettre en oeuvre, d'exécution rapide, peu onéreux, automatisable et utilisable pour le typage individuel.

5           On a maintenant trouvé un nouveau procédé pour déterminer le génotype HLA DR d'un individu, qui pallie les inconvénients décrits ci-dessus en permettant de détecter et de différencier des séquences homologues à un nucléotide près.

10           Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre à l'aide d'un ensemble de sondes nucléotidiques choisies de façon à permettre un typage avec un nombre minimum de sondes. Cet ensemble de sondes présente notamment l'avantage de permettre d'opérer à une température unique, notamment à 37° C. (bien qu'il soit possible d'opérer à une autre température, comme on le verra dans la partie expérimentale ci-après). Un tel ensemble de sondes fait également  
15           partie de l'invention.

          L'ensemble des sondes de l'invention qui sera défini ci-après, peut être utilisée sous la forme de sondes de détection (marquées avec un agent traceur usuel) dans les techniques du type Southern,  
20           ou, de préférence, sous la forme de sondes de capture (technique sandwich ou reverse dot blot) immobilisées sur un support solide, soit par fixation passive (adsorption) directement ou par l'intermédiaire d'un ligand), tel qu'un ligand hydrophobe (voir par exemple la demande de brevet européen N° 0 405 913), soit par  
25           l'établissement d'au moins une liaison covalente qui peut être faite ici encore directement ou par l'intermédiaire d'un ligand capable de se fixer par covalence sur le support (voir par exemple la demande de brevet PCT N° WO 88/01302). L'immobilisation des sondes peut être réalisée soit à l'aide de procédés connus, soit à l'aide d'autres  
30           procédés qui seront décrits ci-après.

          Les sondes de l'invention (sondes nucléotidiques) vont être décrites principalement sous la forme de séquences nucléotidiques. Il est évident pour l'homme du métier que, même pour le cas de sondes destinées à détecter des mutations ponctuelles, à une  
35           température donnée, il est possible d'envisager l'utilisation de sondes de longueur (nombre de nucléotides) variable, dans une certaine mesure, grâce notamment à l'emploi de solutions, tampons favorisant plus ou moins la stabilité des complexes d'hybridation. Les sondes de l'invention sont donc définies par une séquence qui



pourra être généralement considérée comme maximum (en particulier si on souhaite travailler à température relativement basse, par exemple à 37° C), avec en outre l'indication d'une séquence minimum qui sera encore utilisable à ladite température et qui sera sensible à une mutation même ponctuelle.

Il est évident pour les spécialistes qu'à chaque sonde nucléotidique particulière correspond une sonde complémentaire, qui est bien entendu capable de jouer le même rôle en tant que sonde de capture ou de détection. L'invention s'étend donc à de telles sondes ayant une séquence complémentaire de celles qui seront décrites ci-après.

Il est également évident pour les spécialistes qu'il est généralement possible de remplacer, dans un ensemble de sondes, l'une des sondes reconnaissant une spécificité quelconque X par un système de deux sondes reconnaissant l'une, des spécificités X et Y, et l'autre, des spécificités X et Z, auquel cas des réponses positives à la fois avec la sonde XY et avec la sonde XZ permettent de conclure à la présence de la spécificité X. L'invention s'étend donc à un système de sondes, tel qu'il sera défini ci-après, dans lequel une ou plusieurs sondes sont remplacées par un tel système équivalent de deux sondes ou plusieurs sondes. Bien entendu, un tel système associatif peut être appliqué à un nombre de spécificités supérieur à 2.

L'invention a pour objet des sondes nucléotidiques utilisables dans les techniques de typage par oligonucléotides pour effectuer le typage HLA DR, ces sondes étant choisies parmi les suivantes :

- TGGCAGCTTAAGTTT
- CCTAAGAGGGAGTG
- GCGAGTGTGGAACCT
- AAGACAGGCGGGC.

Les quatres séquences qui viennent d'être mentionnées sont désignées, respectivement, par les numéros de référence 101, 102, 103 et 104.

La sonde 101 permet d'identifier le type DRB1\*01.

La sonde 102 permet d'identifier le type DRB1\*02.

La sonde 103 permet d'identifier le type DRB4\*01 et  
la sonde 104 sert dans l'identification du type DRB1\*1305.

L'invention concerne également un ensemble de sondes  
nucléotidiques, ou un kit de type HLA, comprenant au moins une sonde  
choisie parmi les sondes 101 à 104.

L'invention a également pour objet un tel ensemble de  
sondes contenant en outre au moins une sonde choisie parmi les  
suivantes :

- GTGGACAACTACTG - GATACTTCTATCACCAA - GCCTGATGAGGAGTAC  
- TGGCAGGGTAAGTATAAG - GGGCCCTGGTGGACA - TGCGGTATCTGCACA  
- GGAGGAGGTTAAGTT - CTGGAAGACGAGCG - TGGAAGACAAGCGG  
- TGCGGAGCACTGGA - AACCAGGAGGAGAACGTG - ACTCTACGGGTGAGTG  
- GACACCTATTGCAGAC -

La partie soulignée correspondant à une séquence minimum.

Les treize séquences qui viennent d'être mentionnées sont  
désignées respectivement sous les numéros de référence 105 à 117.

Selon un mode de réalisation préféré, la sonde 111 est  
utilisée sous sa forme complète, y compris les deux T non soulignés  
à l'extrémité 3'. Elle a la même spécificité que la sonde 45.

La sonde 115 est utilisée de préférence sous la forme de la  
séquence soulignée augmentée des deux A non soulignés à l'extrémité  
5'. Elle a la même spécificité que la sonde 28.

Les sondes 105 à 110, 112 à 114, 116 et 117 sont utilisés  
de préférence sous la forme des sondes ayant dans la partie  
expérimentale ci-après les numéros de référence 43, 9, 10, 14, 17,  
44, 46, 48, 47, 24 et 27.

L'invention concerne notamment un ensemble de sondes tel  
que défini ci-dessus, caractérisé par le fait qu'il comprend en  
outre l'une au moins des sondes suivantes (la partie soulignée  
correspondant à la séquence optimum) :

- GAGGAGGACTTGCGCT - TACGGGGCTGTGGAG - GGAGCTGCGTAACT  
- TTCCTGGAGAGACAC - GGGAGAGATACTTCC.

Les cinq séquences qui viennent d'être mentionnées sont désignées respectivement par les numéros de référence 118 à 122. Ces séquences sont utilisées notamment sous la forme des sondes portant les numéros de référence 42, 42 bis, 52, 37 et 55.

Les sondes spécifiques indiquées ci-dessus peuvent être utilisées notamment comme sondes de capture ou de détection. Elles sont utilisées de préférence sous la forme de sondes de capture immobilisées ou immobilisables sur un support solide.

L'invention a également pour objet un procédé pour déterminer le typage HLA DR $\beta$  d'un individu, selon les techniques usuelles de typage par oligonucléotides, caractérisé par le fait que l'on utilise comme sondes de capture ou de détection, soit séquentiellement, soit simultanément, au moins une partie des sondes de l'ensemble de sondes tel que défini ci-dessus :

Dans un procédé automatisé, on utilisera l'ensemble des sondes. Dans d'autres cas, il est évidemment possible de les utiliser l'une après l'autre, et d'arrêter le procédé lorsque les renseignements recueillis suffisent à déterminer le typage.

Le procédé de l'invention comprend donc essentiellement les étapes consistant :

- à mettre en contact selon une technique particulière choisie, des échantillons d'acides nucléiques cibles contenant les régions polymorphes du gène HLA DR d'un individu, avec au moins une partie de l'ensemble des sondes tel que défini ci-dessus,
- à faire incuber, selon les méthodes connues, dans des conditions prédéterminées telles que l'hybridation avec chaque sonde ne se produit que si la cible contient une séquence parfaitement complémentaire de celle de ladite sonde, et
- à déterminer, selon les techniques de détection usuelles, l'hybridation ou l'absence d'hybridation avec chacune des sondes utilisées.

Les informations recueillies sont ensuite utilisées pour

déterminer le typage en fonction d'un plan de typage préétabli, tenant compte des sondes utilisées et de la connaissance des types HLA DR et/ou sous types associés répertoriés. Ce travail est simplifié par l'utilisation d'un plan de typage, c'est à dire en pratique un tableau donnant directement les types et/ou sous types en fonction des réponses positives (hybridation(s)) observées. Pour l'ensemble des sondes de la présente invention, un tel tableau est donné ci-après dans la partie expérimentale (voir tableau 6).

L'invention concerne en particulier un procédé tel que défini ci-dessus, dans lequel on utilise lesdites sondes comme sondes de capture, ce procédé pouvant être caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes consistant à :

a) immobiliser chaque sonde de capture sur un support solide,

b) mettre en contact chaque sonde de capture immobilisée avec un milieu liquide contenant au moins un fragment d'acide nucléique cible, dans des conditions prédéterminées permettant l'hybridation si la séquence complémentaire de celle de la sonde est présente dans la cible et

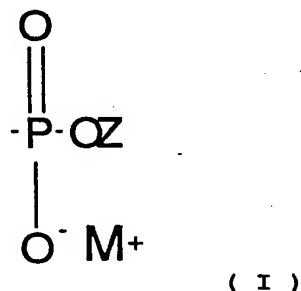
c) détecter la présence d'hybrides éventuellement formés.

Bien entendu, les sondes de l'invention permettent de détecter aussi bien des fragments cibles d'ARN que d'ADN. Par ailleurs, il est évident que l'on peut utiliser comme sonde de détection outre les sondes ci-dessus, toutes sondes appropriées, notamment l'une des sondes décrites ci-après dans l'exemple 5.

Lorsque la sonde de capture est très courte, c'est-à-dire inférieure à 20 nucléotides et en particulier inférieure à 17 nucléotides, il devient nécessaire de mettre en oeuvre des moyens permettant d'améliorer la fixation de la sonde sur un support solide. La fixation de la sonde sur le support est effectuée alors sous la forme d'un dérivé résultant du couplage covalent de la sonde avec un ligand facilitant la fixation sur le support solide. Le ligand, qui peut comprendre une partie hydrophobe est notamment un ligand comprenant au moins un groupement fonctionnel polaire, par

exemple un groupement aminé. Le groupement fonctionnel peut servir à fixer la sonde sur le support solide par établissement d'une liaison covalente. Lorsque le groupement fonctionnel polaire ne réagit pas avec le support, il améliore la fixation par adsorption sur le support, même si le support est hydrophobe.

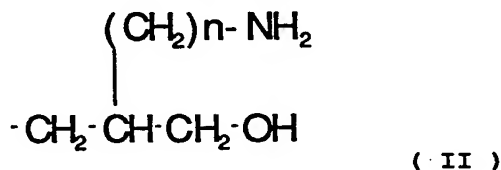
Le ligand est par exemple choisi parmi les protéines et les composés tels que représentés respectivement par les formules I et II ci-dessous :



dans laquelle :

Z représente un radical alkyle ou alcényle de 2 à 12 atomes de carbone, linéaire ou ramifié, non substitué ou substitué par un ou plusieurs groupements choisis parmi les groupements hydroxy et/ou amino, et m+ représente notamment un ion alcalin ou ammonium.

Ce ligand est couplé préférentiellement à l'extrémité 5' de la séquence nucléotidique de la sonde de capture



dans laquelle n est un nombre entier pouvant varier de 1 à 4 et de préférence n = 1 ou 4.

Ce ligand est couplé préférentiellement à l'extrémité 3' de la séquence nucléotidique de la sonde de capture.

Lorsque le ligand est une protéine, on choisit par exemple une albumine, de préférence l'albumine de sérum de bovin, qui peut être couplée à l'extrémité 5' ou 3' de la séquence nucléotidique de la sonde de capture.

Le support de la présente invention peut être tout support

permettant d'immobiliser une séquence nucléotidique ou un dérivé selon l'invention, soit par adsorption passive soit par covalence. Les supports peuvent être réalisés en tout matériau habituellement utilisé tel que nitrocellulose, nylon, papier, ou de préférence, en  
5 un matériau hydrophobe tel qu'un polymère de styrène ou un copolymère à base de styrène comprenant au moins 10 % en poids de motifs styrène.

Le support solide selon l'invention peut être sans limitation sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une feuille, d'un  
10 tube, d'un cône, de puits ou analogues.

Selon le procédé de la présente invention, un échantillon contenant un acide nucléique est obtenu à partir d'un individu dont le génotype HLA DR doit être déterminé. Tout type de tissu contenant de l'acide nucléique HLA DR peut être utilisé dans le cadre de la  
15 présente invention. Il est ainsi possible d'utiliser des fragments d'acide nucléique (ADN ou ARN) obtenus après coupure par voie chimique, enzymatique ou analogue de l'acide nucléique présent dans l'échantillon de l'individu.

Cependant l'incorporation d'une étape préalable d'amplification de l'ADN ou de l'ARN cible peut faciliter le procédé de typage par oligonucléotide de la présente invention. Le principe de l'analyse du polymorphisme HLA par hybridation d'oligonucléotides spécifiques de séquences reste le même, mais une étape d'amplification sélective permet un enrichissement en séquences de  
20 la cible, ce qui simplifie la technique (R.K. Saiki, T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis et H.A. Erlich (1986) Nature 324, 163 - J.M. Tiercy, M. Jeannet et B. Mach (1990) Eur. J.Immunol. 20, 237).

L'amplification peut être obtenue soit à partir d'ADN, soit à partir d'ARN. Il est évident pour un homme du métier que  
30 l'amplification des séquences de la cible HLA DR dans un échantillon peut être accomplie par toute méthode connue qui permet d'obtenir une amplification suffisante pour que la séquence de la cible puisse être détectée par hybridation d'un acide nucléique à une sonde.

En général, l'acide nucléique dans l'échantillon sera de  
35 l'ADN, le plus souvent de l'ADN génomique. Cependant, la présente invention peut également être mise en oeuvre avec d'autres acides nucléiques tels que de l'ARN messager ou de l'ADN cloné, et l'acide nucléique dans l'échantillon de l'individu pourra être sous la forme d'un simple brin ou d'un double brin. Bien entendu, lorsque l'acide

nucléique est sous la forme double brin, il est nécessaire de pratiquer une étape de dénaturation pour obtenir un acide nucléique simple brin.

Les sondes utilisées dans la présente invention sont des oligonucléotides spécifiques d'une séquence (OSS) qui, dans des conditions appropriées, peuvent se lier spécifiquement à leurs séquences complémentaires. Si une sonde particulière peut être utilisée pour identifier uniquement un allèle, la sonde est alors appelée OSA, c'est-à-dire oligonucléotide spécifique d'un allèle. Il est possible qu'une seule sonde ne soit pas capable d'identifier à elle seule un allèle spécifique DR $\beta$  en raison de la nature différente entre divers allèles DR $\beta$ .

Selon le procédé de l'invention, l'identité d'un allèle est déduite à partir d'un modèle de liaison d'un ensemble de sondes, chaque sonde individuelle de l'ensemble étant spécifique de différentes parties du gènes HLA DR. Grâce au choix de multiples sondes correspondant aux séquences d'ADN des allèles connus, la spécificité du procédé de typage par oligonucléotides de la présente invention permet d'identifier tous les allèles des loci DRB1, DRB3 et DRB5. Bien entendu, le procédé de la présente invention pourrait être utilisé pour identifier les allèles d'autres loci extrêmement polymorphes tels que DQB1 et DPB1. Comme les différences alléliques sont essentiellement localisées dans l'exon codant pour le premier domaine des molécules HLA (aa 5-94), les sondes sont choisies pour être complémentaires de séquences spécifiques localisées dans cette région. Au cas où de nouveaux allèles seraient découverts, ceux-ci sont immédiatement répertoriés dans un registre de séquences HLA classe II, qui permet d'actualiser la collection de traceurs informatifs et donc d'adapter la méthodologie à la détection de tout nouvel allèle.

Pour rationaliser le typage HLA classe II complet, on a proposé d'introduire tout d'abord une première étape du typage DR générique, lequel peut, avec un nombre limité de sondes, reconnaître les principales spécificités HLA-DR, c'est-à-dire HLA-DR1-DRw18. Cette étape est suffisante pour un grand nombre d'applications cliniques (voir B. Mach et J.M. Tiercy (1991) Human Immunol. 30, 278).

Sur la base des résultats de cette première étape, il est possible de choisir les sondes spécifiques nécessaires pour

réaliser, dans un deuxième temps, un micropolymorphisme DR $\beta$ , pour détecter le polymorphisme DQB1 et si nécessaire pour caractériser les allèles DPB1.

5 L'analyse des spécificités HLA-DR1-DRw18 par la technique de typage par oligonucléotides peut être appliquée dans les laboratoires d'histocompatibilité pour le typage DR de routine, en remplacement de la sérologie DR, notamment pour effectuer le typage DR de patients en liste d'attente pour une greffe rénale ou le typage de donneurs de reins potentiels, le typage DR de patients  
10 leucémiques pour lesquels une greffe de moelle osseuse est envisagée, ainsi que des membres de leur famille ou des donneurs potentiels non apparentés, le typage DR à grande échelle pour la constitution de registres de donneurs de moelle volontaires, pour déterminer des associations entre des maladies et le système HLA,  
15 par exemple dans le cas de diabètes insulino-dépendants, pour des applications en médecine prédictive ou encore pour des recherches de paternité et autres identifications judiciaires.

On donne ci-après quelques définitions de termes utilisés dans la présente demande :

20 "génotype" fait référence à l'ensemble des caractéristiques génotypiques d'un individu par opposition au "phénotype" qui sont les caractérisations d'un individu telles qu'elles ressortent de l'analyse des produits d'expression du gène et notamment des protéines.

25 "allèles" sont les différentes formes alternatives d'un même gène qui présentent des différences au niveau de la séquence nucléique. Ces différences se manifestent au niveau de l'ADN, de l'ARN et des protéines.

"polymorphisme" caractérise la diversité introduite dans une  
30 population par l'existence d'allèles différents pour un même gène. "oligonucléotide" tel qu'utilisé ici désigne les amorces, les sondes, les fragments d'acides nucléiques devant être détectés, etc... Les oligonucléotides peuvent être préparés par toute méthode appropriée connue.

35 "sonde nucléotidique" représente un fragment d'ADN ou d'ARN naturel, ou un oligonucléotide naturel ou de synthèse, ou un fragment d'ADN ou d'ARN de synthèse, non modifié ou comprenant une ou plusieurs bases modifiées telles que l'inosine (symbolisée par la lettre I), la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-



désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation.

Par ailleurs, dans la présente demande lorsque les séquences des sondes de capture sont soulignées, ceci représente la séquence optimale pour un typage selon l'invention. Bien entendu, ces séquences optimales peuvent être rallongées à l'extrémité 3' et/ou 5' par au moins une base. Dans ce cas, certaines bases pouvant être ajoutées facultativement ont été indiquées entre parenthèses comme on peut le voir par exemple à la lecture de la description ci-dessus. Enfin, il est possible pour un homme du métier de modifier la longueur des séquences utilisées en fonction des conditions opératoires (telles que : les températures d'hybridation, de lavage, la nature du tampon d'hybridation et/ou de lavage) et du plan de typage.

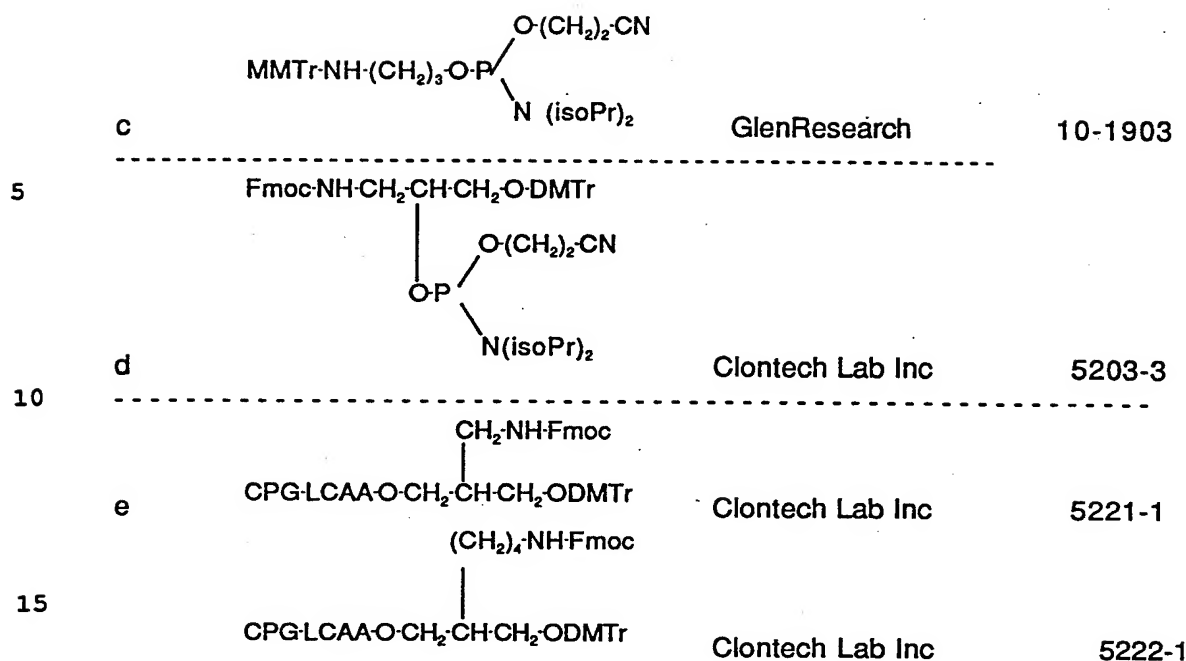
L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre, faite en référence à des exemples non limitatifs illustrant des modes de réalisation préférés du procédé de l'invention.

#### EXEMPLE 1 :

Les ligands utilisés dans la présente invention et donnés ici à titre d'exemple, peuvent être des composés disponibles dans le commerce tels que dans le tableau 1 ci-après :

TABLEAU 1

ligand	Formule	Fournisseur	ref
a	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{CF}_3\text{-C-NH-(CH}_2\text{)}_6\text{-OP} \begin{array}{l} \nearrow \text{OCH}_3 \\ \searrow \text{N(isoPr)}_2 \end{array}  \end{array}  $	Applied Biosystems	400808
b	$  \begin{array}{c}  \text{O-(CH}_2\text{)}_2\text{CN} \\  \nearrow \\  \text{MMTr-NH-(CH}_2\text{)}_{12}\text{-O-P} \searrow \text{N(isoPr)}_2  \end{array}  $	Clontech Lab Inc	5206-1



MMTr = monomethoxytrityl

DMTr = dimethoxytrityl

Fmoc = fluorenyl-9-methoxycarbonyl

CPG = billes de verre à porosité contrôlée

LCAA = longue chaîne alkyle amine (bras espaceur)

Le couplage d'un ligand phosphoramidite à un oligonucléotide est effectué selon le protocole général suivant :

Un oligonucléotide est synthétisé sur un appareil automatique 381 A de la société APPLIED BIOSYSTEMS en utilisant la chimie des phosphoramidites selon le protocole du constructeur. Le ligand phosphoramidite dissout dans de l'acétonitrile anhydre à une concentration de 0,2 M, est placé en position X du synthétiseur et l'addition du ligand se fait à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide selon le protocole standard de la synthèse automatique lorsque la synthèse de l'oligonucléotide est achevée.

Dans le cas où le ligand est porteur d'un groupement protecteur dimethoxytrityle, tel que pour le composé d, il est nécessaire d'effectuer une étape supplémentaire de déprotection du groupement trityle par l'acide trichloroacétique en fin de synthèse.

Après déprotection une nuit à 55° C dans NH<sub>4</sub>OH 33 %, suivie d'une précipitation dans de l'éthanol à - 20°C, l'oligonucléotide

est séché sous vide et repris dans 1 ml d'H<sub>2</sub>O.

Pour les composés référencés b et c, une étape supplémentaire de clivage du groupement monomethoxytrityle est effectuée selon le protocole du fabricant (CLONTECH et GLEN RESEARCH respectivement) après déprotection.

Dans le cas des composés portant la référence e et f, la synthèse automatique démarre par la silice greffée par le ligand selon le protocole standard. Le couplage ligand et oligonucléotide s'effectue par l'extrémité 3' de ce dernier.

Dans tous les cas, les oligonucléotides modifiés à leurs extrémités 5' ou 3' sont purifiés par chromatographie liquide haute pression (CLHP) en phase inverse sur une colonne Brownlee RP18 (10 mm - 25 cm).

Conditions : débit 4,6 ml/min

Gradient 10 % à 35 % de tampon B en 30 min.

35 % à 100 % de tampon B en 3 min.

Les caractéristiques des tampons A et B sont les suivantes.

Tampon A : 0.1 molaire Triethylammoniumacétate (TEAA) pH = 7,00

Tampon B : 50 % Tampon A + 50 % CH<sub>3</sub>CN.

#### EXEMPLE 2 :

Couplage d'un oligonucléotide à l'Albumine de Sérum de boeuf (ASB).

Un oligonucléotide portant le bras aminolink 2 référencé a dans le tableau 1 est synthétisé tel que décrit dans l'exemple 1 :  $3 \cdot 10^{-8}$  mole d'oligonucléotide sont séchés sous vide et repris dans 25 µl de tampon borate de sodium 0.1 M, pH 9.3. On additionne 500 µl d'une solution à 30 mg/ml de DITC (phénylène-1,4-diisothiocyanate Fluka 78480) dans le DMF. Le mélange est agité 1,5 h à température ambiante avant l'addition de 3 ml d'H<sub>2</sub>O. Après extraction de la solution par le butanol (3 x 3 ml), la phase aqueuse restante (500 µl) est séchée sous vide puis reprise par  $1 \cdot 10^{-7}$  mole (6,6 mg) d'ASB (Pierce 30444) dans 400 µl de tampon borate (0,1 molaire pH 9.3). Après une nuit sous agitation à température ambiante, le conjugué est purifié par échange d'ions en CLHP sur une colonne AX300 (BROWNLEE 4.6 x 100 mm) par un gradient de NaCl (Tableau 1). Le pic du conjugué est dialysé contre de l'eau (2 x 1 litre) concentré sous

vide, repris par 1 ml H<sub>2</sub>O et stocké à - 20° C.

Conditions chromatographiques :

Gradient de : 10 % B' à 56 % B' en 25 min.

56 % B' à 100 % B' en 2 min.

5

Les caractéristiques des tampons A' et B' sont les suivantes :

A' = 20 mM phosphate de sodium, pH 7,00; 20 % CH<sub>3</sub> CN.

B' = Tampon A' + 1 M NaCl ou 2M NaCl.

10 EXEMPLE 3 :

On a représenté dans le tableau 2 les alignements d'acides aminés des différents allèles du gène DR Beta dans le but de définir les positions des acides aminés mutés par rapport à la séquence consensus choisie (appelée "DR CONS"). Ces mutations correspondent à des mutations non silencieuses au niveau de l'ADN c'est à dire des mutations qui induiront un changement d'acide aminé. On sait en effet que les acides aminés sont codés au niveau de l'ADN par des triplets de bases. Une mutation sur la troisième position n'entraînera généralement pas de changement d'acide aminé. Par contre le changement de la seconde base induira assez souvent un changement d'acide aminé. Enfin, une mutation sur la première base entraînera toujours une modification de l'acide aminé.

Dans le cas du typage des différents allèles, on utilise donc le plus souvent les mutations sur l'ADN correspondant aux mutations non silencieuses. Mais il est possible de détecter une mutation de type silencieuse, par exemple dans le but de différencier 2 allèles très proches.

Dans le tableau 3, on a représenté les alignements des nucléotides du gène DRBeta pour tous les allèles connus et publiés dans la littérature à ce jour, par rapport à la même séquence consensus que dans le tableau 2.

La nomenclature utilisée pour désigner les différents allèles et celle proposée lors de la cinquième conférence d'histocompatibilité (Leiden, Hollande, 1991). Les indications entre parenthèses dans le tableau 2 représente la nomenclature précédente.

TABLEAU 2

DR CONS	10	20	30	40	50	60	70	80	90
	*	*	*	*	*	*	*	*	*
PRELEQKSECHFFNGTFRVFLDRFYFNQEEYVRFDSVGEYRAVTELGPRDAEYWNQKDLLEQRRAAVDTCRHNHYGVGESFTVQRR									
DRB1*0101 (Dw1)	---	W-L-F	---	L-E-CI	---	S	---	---	---
DRB1*0102 (Dw20)	---	W-L-F	---	L-E-CI	---	S	---	---	AV
DRB1*0103 (DwBON)	---	W-L-F	---	L-E-CI	---	S	---	I-DE	---
DRB1*1501 (Dw2)	---	W-P-R	---	---	---	S	---	I-A	---
DRB1*1502 (Dw12)	---	W-P-R	---	---	---	S	---	I-A	---
DRB1*1601 (Dw21)	---	W-P-R	---	---	---	S	---	F-D	---
DRB1*1602 (Dw22)	---	W-P-R	---	---	---	S	---	L-D	---
DRB1*0301 (DRW17)	---	YST	---	Y	---	H-N	---	F	---
DRB1*0302 (DRW18)	---	YST	---	E-H	---	N	---	K-GR-N	---
DRB1*0401 (Dw4)	---	V-H	---	H	---	H	---	K	---
DRB1*0402 (Dw10)	---	V-H	---	H	---	H	---	I-DE	---
DRB1*0403 (Dw13TAS)	---	V-H	---	H	---	H	---	E	---
DRB1*0404 (Dw14)	---	V-H	---	H	---	H	---	V	---
DRB1*0405 (Dw15)	---	V-H	---	H	---	H	---	S	---
DRB1*0406 (KT2)	---	V-H	---	H	---	H	---	E	---
DRB1*0407 (Dw13JHA)	---	V-H	---	H	---	H	---	E	---
DRB1*0408	---	V-H	---	H	---	H	---	K	---
DRB1*0409	---	V-H	---	H	---	H	---	S	---
DRB1*0410	---	V-H	---	H	---	H	---	S	---
DRB1*0411	---	V-H	---	H	---	H	---	S	---
DRB1*0701 (Dw17)	---	W-G-YK	---	Q-E-L	---	F	---	I-D-GQ	---
DRB1*0702 (DB1)	---	W-G-YK	---	Q-E-L	---	F	---	I-D-GQ	---
DRB1*0801 (NADURA)	---	YSTG-Y	---	---	---	S	---	F-D-L	---
DRB1*0802 (SPL)	---	YSTG-Y	---	---	---	S	---	F-D-L	---
DRB1*0803 (TAB)	---	YSTG-Y	---	---	---	S	---	I-D-L	---
DRB1*0804	---	YSTG-Y	---	---	---	S	---	F-D-L	---
DRB1*0901 (Dw23)	---	---	---	Y-H-GI	---	N	---	V-S	---
DRB1*1001	---	EV-F	---	L-E-RVH	---	A-Y	---	F-R-E	---
DRB1*1101 (SVEIG)	---	YST	---	---	---	E	---	F-D	---
DRB1*1102 (JVM)	---	YST	---	---	---	E	---	I-DE	---

TABLEAU 2 (SUITE)

DR CONS	10	*	*	20	*	*	30	*	*	40	*	*	50	*	*	60	*	*	70	80	90
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	PRFLEQKSECHFFNGTFRVFLDRFYFNQEEYVRFDSDVGEYRAVTELCRPDAYWNSQKDLLEQRAAVDTYCRHNYGVGESFTVQRR																				
DRB1*1103 (UA-S2)	---YST---F---E---F-DE-V-																				
DRB1*1104 (TUBO)	---YST---F---E---F-D-V-																				
DRB1*1201 (HERLUF)	---YSTG-Y---H-H---LL---V-S---I-D---AV-																				
DRB1*1202	---YSTG-Y---H-H---LL---V-S---F-D---AV-																				
DRB1*1301 (HHK)	---YST---H-N---F---I-DE-V-																				
DRB1*1302 (WT46)	---YST---H-N---F---I-DE---																				
DRB1*1303 (HAG)	---YST---S---I-DK---																				
DRB1*1304	---YST---S---I-DE-V-																				
DRB1*1305 (DES.DI)	---YST---H-N---F---F-D---																				
DRB1*1401 (TEM)	---YST---H-F---A-H---R-E-V-																				
DRB1*1402 (AMALA)	---YST---E-H-N---																				
DRB1*1403 (JX6)	---YST---E-H-N---D-L---																				
DRB1*1404	---YSTG---H-F---A-H---R-E-V-																				
DRB1*1405	---YST-Q---H-F---R-E-V-																				
DRB3*0101 (52a)	---LR---Y---H-FL---V-S---K-GR-N-																				
DRB3*0201 (52b1)	---LL---E-H-H---A---R---K-GQ-N-V-																				
DRB3*0202 (52b2)	---LL---E-H-H---A---R---K-GQ-N-																				
DRB3*0301 (52c)	---LL---E-H-F---V-S---K-GQ-N-V-																				
DRB4*0101	---A-C-L---WN-I-I---A-YN-L-Q---R-E-Y-V-																				
DRB5*0101 (Dw2)	---Q-D-Y---H-DI---DL---F-D---																				
DRB5*0102 (Dw12)	---Q-D-Y---H-GI---N---F-D---																				
DRB5*0201 (Dw21)	---Q-D-Y---H-GI---N---I-A---AV-																				
DRB5*0202 (Dw22)	---Q-D-Y---H-GI---N---I-A---AV-																				



TABLEAU 3 (suite)



**EXEMPLE 4 :**

En utilisant les 2 protocoles décrits précédemment on a synthétisé des oligonucléotides portant soit un ligand, tel que décrit dans l'exemple 1 et qui sont résumés dans le tableau 4, soit couplé à l'ASB, tel que décrit dans l'exemple 2 et qui sont résumés dans le tableau 5

**TABLEAU 4**

Ref.	N°	sequence 5'-3' ***	ligand X *	tr **
1	563	CTGGAAAGATGCA	a	17,11
2	562	TGGAAAGATGCAT	a	17,63
3	561	CAGGATAAGTATGA	a	17,52
4	579	GCAGGATAAGTATGA	a	16,7
5	603	CAGCAGGATAAGTATG	b	17,44
6	1094	CAGCAGGATAAGTATG	a	16,25
7	546	TGGACAACTACTG	a	18,61
7 bis	570	GGACAACTACTG	a	16,09
8	596	GGACAACTACTG	b	17,29
9	545	GATACTTCTATCACC	a	19,2
10	398	CCTGATGAGGAGTA	a	14,6
11	573	CAGGGTAAGTATAAG	a	16,18
12	580	GCAGGGTAAGTATAAG	a	16,99
13	1064	TGGCAGGGTAAGTAT	a	17,55
14	591	GGCAGGGTAAGTATAAG	b	18,18
15	1095	GGCAGGGTAAGTATAAG	a	17,13
16	400	GGCCCTGGTGGA	a	13,79
17	595	GGCCCTGGTGGA	b	17,43
18	574	GCGGTATCTGCACA	a	16,62
19	556	GGAGGAGGTTAAG	a	17,94
20	555	TGGAAGACGAGC	a	16,1
21	755	TGCGGAGCACTGGA	a	16,85
22	867	GGAAGACAAGCG	a	13,36
23	915	CTCTACGGGTGAG	a	19,04
24	1066	CTCTACGGGTGAGT	a	17,14
25	990	CACCTATTGCAGA	a	17,47
26	1067	CACCTATTGCAGAC	a	17,08
27	1068	ACACCTATTGCAGA	a	17,81
28	802	CCAGGAGGAGAACGT	a	15,86
29	1096	CCAGGAGGAGAACGT	c	15,77
30	1097	CCAGGAGGAGAACGT	d	13,74
31	1098	CCAGGAGGAGAACGT	e	14,03
32	1099	CCAGGAGGAGAACGT	f	14,81
33	1100	CCAGIAGGAGAACGT	a	14,97
34	1107	ACCAGIAGGAGAACGT	a	16,05
34 bis	1127	AACCAGIAGGAGAACGT	a	16,62
35	935	ACCAGGAGGAGAACGTG	-	19,29
36	997	GAGCTGCGTAAG	a	16,55
37	1033	TTCTTGGAGAGACAC	a	18,4
38	1030	TTCTTGGAGAGATAC	a	18,39
39	1065	TCCTTGGAGAGATACT	a	18,01
40	1058	GGAGGACTTGCGC	a	17,9
41	1059	GGAGGACTTGCGCT	a	18,35
42	1060	AGGAGGACTTGCGC	a	17,05
42 bis	1061	ACGGGGCTGTGGA	a	16,79

\* X représente le ligand selon la nomenclature utilisée précédemment dans le tableau 1

\*\* Tr représente le temps de rétention en minutes (min) de l'oligonucléotide en CLHP dans les conditions décrites dans l'exemple 1 (colonne BROWNLEE RP 18 (4,6 mm-25 cm) débit 1 ml/min).

\*\*\* la lettre I dans les séquences 33, 34 et 34 bis représente l'inosine.

TABLEAU 5

	REFERENCEN	NUMERO	SEQUENCE 5'-3'	TR *	RATIO ** OLIGO/ASB
5	43	571B	TGGACAACTACT	7,85 (2M)	1
	44	574B	GCGGTATCTGCACA	8,69 (2M)	0,8
	45	556B	GGAGGAGGTTAAG	7,76 (2M)	1
	46	555B	TGGAAGACGAGC	16,85 (1M)	0,8
	47	756B	GCGGAGCACTGG	17,78 (1M)	1,5
10	48	867B	GGAAGACAAGCG	16,65 (1M)	1,1
	49	868B	TGGAAGACAAGC	8,56 (2M)	1,3
	50	856B	GAGGAGCTCCTGCGCT	19,96 (1M)	1,2
	51	966B	AGGAGAACGTGC	19,66 (1M)	1,5
	52	997B	GAGCTGCGTAAG	18,88 (1M)	0,9
15	53	998B	AGCTGCGTAAGT	16,32 (1M)	1
	54	1026B	GAGAGACACTTCC	13,98 (1M)	0,5
	55	986B	GGAGAGATACTTC	15,81 (1M)	0,6
	56	1049B	GAGAGATACTTCC	15,86 (1M)	1,2
	57	1089B	ACGGGGCTGTG	17,72 (1M)	1,1
	58	1090B	TACGGGGCTGT	17,24 (1M)	1
	59	1091B	CGGGGCTGTGG	17,42 (1M)	1,1

\* Tr représente le temps de rétention en minutes (min) de l'oligonucléotide couplé à l'ASB en CLHP dans les conditions décrites dans l'exemple 2.

(1M) signifie que le tampon B contient 1M NaCl.

(2M) signifie que le tampon B contient 2M NaCl.

\*\* L'oligonucléotide est quantifié en picomoles par spectrométrie U.V. en mesurant l'absorbance à 260 nm selon le protocole APPLIED BIOSYSTEMS. L'ASB est dosé par la méthode de BRADFORD (BRADFORD M.M., Anal.Biochem., 72,248 (1976)) en picomoles. Le ratio oligo/ASB est le rapport de ces 2 valeurs.

On a défini dans cet exemple des oligonucléotides de capture que l'on peut synthétiser, sans ligand, avec un ligand ou bien coupler par exemple à l'ASB. Le choix des séquences des oligonucléotides synthétisés tient compte de l'alignement des séquences d'ADN des différents allèles décrits dans le tableau 3 de l'exemple 3. Les sondes oligonucléotidiques sélectionnées, utilisées par exemple comme sondes de capture, permettent d'effectuer un plan de typage comme décrit dans le tableau 6. Il est bien évident pour l'homme de l'art que d'autres plans de typage peuvent être définis avec d'autres oligonucléotides.

## TABLEAU 6

[illegible]

Dans le tableau 6, les indications entre parenthèses représentent la nomenclature utilisée avant la conférence d'histocompatibilité (1991) des sous types de l'allèle DRB5.

Le signe + signifie que le sous type de la ligne considérée du tableau 6 donne une hybridation avec la sonde de la colonne correspondante.

A l'aide du tableau 6, il est possible d'interpréter facilement les résultats obtenus (hybridation ou absence d'hybridation) avec diverses sondes par exemple une cible donnant une réponse positive avec les sondes 43, 14, 28 et 37 correspond aux types DRB1\*0301/DRB1\*07.

#### EXEMPLE 5: préparation des sondes de détection

Selon l'exemple 2 l'oligonucléotide activé et séché sous vide est repris par  $1,25 \cdot 10^{-7}$  mole (5 mg) de peroxydase de raifort (BOEHRINGER MANHEIM 413470) dans 200  $\mu$ l de tampon borate de sodium 0,1M, pH 9,3.

Le protocole de purification est identique : le conjugué est stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans un tampon 50 mM tris HCl, pH 7,0, 40% glycérol.

Le tableau 7 résume les différents conjugués utilisés pour la détection HLA DR.

TABLEAU 7

REFERENCE	SEQUENCE 5'-3' ***	TR *	RATIO ** OLIGO/HRP
D1	CCGGGCGGTGAC (GT) GAGCTGGGGC	11,88 (2M)	1,4
D2	CCGGGCGGTGACIGAGCTGGGGC	18,09 (2M)	1,8
D3	GAACAGCCAGAAGGAC	9,32 (2M)	1

\* Tr représente le temps de rétention en minutes (min) de l'oligonucléotide couplé à la peroxydase de raifort (HRP) en CLHP dans les conditions décrites dans l'exemple 2.

(2M) signifie que le tampon B contient 2M NaCl.

\*\* L'oligonucléotide est quantifié en picomoles par spectrométrie U.V. en mesurant l'absorbance à 260 nm selon le protocole APPLIED BIOSYSTEMS. La peroxydase de raifort (HRP) est dosée par U.V. à 402 nm en picomoles selon ATOR M.A., J.Biol. Chem., 31,14954 (1987). Le ratio oligo/HRP est le rapport de ces 2 valeurs.

\*\*\* la lettre I dans la séquence D2 représente l'inosine. Dans la séquence D1, (GT) signifie qu'il y a un mélange équimolaire des 2 bases G et T sur cette position.

5     EXEMPLE 6 : préparation du matériel génétique

10     L'extraction d'acides nucléiques à partir de sang total est effectuée dans un appareil Applied Biosystems d'après le protocole suivant : 2 à 6 ml de sang total sont repris dans du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8,00, 1 mM EDTA) (quantité suffisante pour 6 ml) et sont déposés dans une ampoule d'extraction de 30 ml. Une solution de protéinase K (840 unités dans 20 mM Tris-HCl pH 8,5) est ajoutée. L'ensemble est incubé sous agitation 1 heure à 55°C. L'excès de protéines présentes est éliminé par 2 extractions simultanées (8,5  
15     ml) par un mélange de phénol chloroforme. L'ensemble est agité pendant 20 minutes à 60°C. Après élimination de la phase organique une nouvelle extraction phénolique est effectuée. L'excès de phénol est éliminé par une extraction au chloroforme (9,5 ml), 10 minutes à 37°C. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité par addition  
20     de 0,5 ml d'acétate de sodium 3 M pH 5,5 et 13,5 ml d'isopropanol puis récupéré sur un filtre. L'ADN est ensuite repris dans 1 ml d'eau distillée, puis dosé en spectrophotométrie à 260 nm.

25     EXEMPLE 7 : amplification de l'ADN

   L'Amplification enzymatique est effectuée par la technique de réaction en chaîne par la polymérase (PCR) (MULLIS et FALOONA, Meth. in Enzymol. vol. 155, pp 335-350) d'après le protocole suivant :

30     Dans un tube de type Eppendorf sont ajoutés 0,1 à 2 µg d'ADN purifié ou non dans un volume total de 100 µl du tampon suivant :

- 10 µl de tampon de PCR 10 fois concentré (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3 (20°C), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% gélatine)
- 35     - 2 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, TTP) 0,5 µM
- 2 µl de chaque amorce correspondant à 25 pmoles
- 1,5 unités de Taq polymerase (Perkin Elmer Cetus)
- eau distillée (quantité suffisante pour 100 µl)
- 50 µl d'huile de paraffine

   Le tube est déposé dans un Thermocycler (Perkin Elmer Cetus)

dans lequel seront effectués les 35 cycles de températures suivants:

- 0,5 minute de dénaturation à 95°C

- 0,5 minute d'hybridation à 55°C

- 0,5 minute d'élongation à 72°C

5 Les amorces utilisées ont la séquence suivante :

amorce 1 = 5'-CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG-3'

amorce 2 = 5'-TCGCCGCTGCACTGTGAAG-3'

10 EXEMPLE 8 :

Dans un puits d'une plaque de microtitration en polystyrène (Nunc 439454) sont déposés 100 µl d'une solution d'un oligonucléotide de capture d'une spécificité DR donnée à une concentration de 0,15 µM dans du PBS 3 x (0,45 M NaCl, 0,15 M phosphate de sodium pH 7.0). Il y a autant de puits remplis que nécessaires pour le typage.

Dans tous les cas un contrôle positif doit être ajouté dans le but de vérifier l'efficacité de l'étape d'amplification ainsi que l'étape de détection. La sonde de capture qui est utilisée comme contrôle positif est présente sur tous les allèles connus à ce jour et a la séquence suivante :

5'- GGGGAGTACCGGGCGGTGACGGAGCTGGGGCGGCCT - 3'

La plaque est lavée 3 fois avec 300 µl de PBS Tween (0,15 M NaCl, 0,05 M phosphate de sodium, pH 7,0 ; 0,5 % Tween 20 (Merck 822184)). Le produit d'amplification (100 µl) tel que décrit dans l'exemple 7 est dénaturé par 10 µl de NaOH 2 N pendant 5 minutes sous agitation à température ambiante. 10 µl d'acide acétique 2N puis un volume de tampon PEG (Phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,0 , NaCl 0,5 M, Tween 20 0,65 %, ADN de sperme de saumon (Sigma D 9156) 0,14 mg/ml, PEG 4 000 (Merck 807490) 2 %) équivalent à n x 50 µl (n étant le nombre de sondes de capture nécessaires au typage) sont additionnées successivement à cette solution. 50 µl de cette solution sont répartis par puits suivis de 50 µl de la sonde de détection (conjugué oligonucléotide peroxydase) à une concentration de 15 nM dans le tampon PEG. La plaque est incubée 1 h à 37° C et lavée par 3 x 300 µl de PBS Tween. 100 µl de substrat OPD (ortho-phenylenediamine Cambridge Medical Biotechnology ref/456) dans un tampon OPD (0,05 M acide citrique, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,93) à la

concentration de 4 mg/ml auquel on ajoute extemporanément  $H_2O_2$  à 30 volumes au 1/1000, sont ajoutés par puits. Après 20 min de réaction, l'activité enzymatique est bloquée par 100  $\mu$ l d' $H_2SO_4$  1N et la lecture est effectuée sur Axia Microreader (bioMérieux) à 492 nm.

#### EXEMPLE 9:

6 ADN, préparés selon la méthode décrite dans l'exemple 6, sont amplifiés selon la méthode décrite dans l'exemple 7.

Le protocole de typage comporte les sondes de capture suivantes:

5' a-GATACTTCTATCACC 3' = oligonucléotide de spécificité DR 3 portant le ligand a en 5' (référéncé 545 )

5' GATACTTCTATCACC 3' = oligonucléotide de séquence identique mais sans ligand (référéncé 545 nu)

5' a-TGGACAACACTACTG 3' = oligonucléotide de spécificité DR 4 portant le ligand a en 5' (référéncé 546 )

5' TGGACAACACTACTG 3' = oligonucléotide de séquence identique mais sans ligand (référéncé 546 nu)

Le protocole de typage est conforme au protocole général décrit dans l'exemple 8.

Les sondes D1 et D2 (tableau 7) sont utilisées en mélange 50%-50% comme sondes de détection.

Les résultats sont présentés dans le tableau 8 ci-après :

TABLEAU 8

ADN	TYPAGE	DR3 545 NU	DR3 545	DR4 546 NU	DR4 546
1	DR11/DR11	0,019	0,025	0,021	0,025
2	DR4/DR4	0,018	0,021	0,021	0,138
3	DR8/DR7	0,017	0,022	0,019	0,019
4	DR3/DR11	0,026	0,423	0,021	0,027
5	DR3/DR4	0,023	0,176	0,026	0,296
6	DR3/DR3	0,023	0,387	0,023	0,018

Les 2 sondes de capture sans ligand ne différencient pas les spécificités des ADN alors que les mêmes séquences avec le ligand a permettent d'identifier les spécificités DR2 et DR4 des ADN.

5 EXEMPLE 10:

24 ADN, préparés selon la méthode décrite dans l'exemple 6,  
sont amplifiés selon la méthode décrite dans l'exemple 7.  
Le protocole de typage est conforme au protocole général décrit dans  
10 l'exemple 8.

Les sondes D1 et D2 (tableau 7) sont utilisées en mélange 50%-  
50% comme sondes de détection.

Le protocole de typage comporte les sondes de capture  
récapitulées dans le tableau 9 ci-après:

15

TABLEAU 9

20

25

30

35

reference	numéro	sequence 5'-3'
1	563	CTGGAAAGATGCA
5	603	CAGCAGGATAAGTATG
43	571B	TGGACAACTACT
9	545	GATACTTCTATCACC
10	398	CCTGATGAGGAGTA
14	591	GGCAGGGTAAGTATAAG
17	595	GGCCCTGGTGGA
44	574B	GCGGTATCTGCACA
45	556B	GGAGGAGGTTAAG
46	555B	TGGAAGACGAGC
48	867B	GGAAGACAAGCG
47	756B	GCGGAGCACTGG
28	802	CCAGGAGGAGAACGT
24	1066	CTCTACGGGTGAGT
27	1068	ACACCTATTGCAGA
52	997B	GAGCTGCGTAAG
37	1033	TTCCTGGAGAGACAC
55	986B	GGAGAGATACTTC
42	1060	AGGAGGACTTGCGC

Les résultats du typage sont donnés dans la tableau 10:



TABLEAU 10

SONDE	1	5	43	9	10	14	17	44	45	46	48	47
OLIGON°	563	603	571-ASB	545	398	591	595	574-ASB	556-ASB	555-ASB	867-ASB	756-ASB
ADN°												
58	0,017	0,025	0,718	0,013	0,029	1,006	0,072	0,033	0,022	0,018	0,015	0,016
59	0,509	0,024	0,036	0,016	0,029	0,929	0,072	0,031	0,025	0,018	0,037	0,018
63	0,014	0,021	0,030	0,011	0,024	0,050	0,030	0,033	0,023	> 2,500	0,016	0,024
66	0,012	0,027	0,066	0,015	0,023	0,992	0,098	0,031	0,024	0,022	0,060	0,016
67	0,468	0,089	0,035	0,042	> 2,500	0,054	0,030	0,032	0,028	> 2,500	0,042	0,015
68	0,017	0,049	0,037	0,025	0,017	0,826	0,068	0,031	0,024	> 2,500	0,120	0,016
70	0,504	0,018	0,027	0,020	0,076	0,016	0,017	0,033	0,031	0,017	0,070	1,674
71	0,011	0,017	0,031	0,025	> 2,500	0,019	0,030	0,032	0,030	> 2,500	0,020	0,021
72	0,459	1,373	0,046	0,025	0,031	0,085	0,015	0,044	0,037	0,017	0,017	0,019
73	0,353	0,890	0,034	0,018	0,016	0,048	0,021	0,044	0,034	0,019	0,015	0,017
75	0,019	0,052	0,625	1,113	0,044	0,043	0,023	0,033	0,038	0,019	0,018	0,017
78	0,015	0,037	0,625	0,015	0,032	0,589	0,046	0,034	0,031	0,015	0,048	0,019
79	0,014	0,012	0,425	0,013	0,030	0,010	0,015	0,033	0,028	> 2,500	0,039	0,017
80	0,018	0,752	0,041	0,025	0,016	0,448	0,040	0,045	0,030	0,021	0,036	0,016
83	0,014	0,959	0,030	0,022	0,017	0,042	0,536	0,050	0,028	0,073	0,023	0,021
84	0,007	0,013	0,023	0,399	0,015	0,013	0,014	0,031	0,028	1,210	0,042	0,016
85	0,015	0,013	0,468	0,014	0,010	0,018	0,016	0,076	0,034	> 2,500	0,012	0,019
86	0,019	0,747	0,035	0,939	0,023	0,056	0,018	0,041	0,029	0,021	0,070	0,021
87	0,016	1,190	0,035	0,016	0,013	0,046	0,014	0,043	0,029	> 2,500	0,025	0,019
89	0,012	0,032	0,026	0,956	0,015	0,021	0,018	0,032	0,028	0,017	0,014	0,019
90	0,355	0,035	0,031	1,028	0,042	0,038	0,023	0,035	0,036	0,017	0,016	0,022
91	0,866	0,008	0,016	0,014	0,040	0,036	0,015	0,014	0,032	0,020	0,018	0,019
92	0,401	0,015	0,019	0,013	0,010	0,012	0,026	0,021	0,019	0,018	0,014	0,025
95	0,010	0,011	0,048	0,037	0,010	0,017	0,023	0,042	0,016	1,931	1,973	0,024

TABLEAU 10 (SUITE)

SONDE	28	24	27	52	37	55	42			ADN N°	TYPAGE
OLIGON°	802	1066	1068	997-ASB	1033	986-ASB	1060	contrôle +			
ADN N°											
58	0,083	0,026	0,026	0,050	0,759	0,028	0,024	> 2,500		58	DRB1*0301/DRB1*07
59	0,020	0,022	0,039	0,048	0,035	0,023	0,019	> 2,500		59	DRB1*0101-0102/DRB1*07
63	0,083	0,881	0,584	0,777	1,194	0,026	0,030	> 2,500		63	DRB1*12/DRB1*1301
66	0,024	0,023	0,015	0,036	0,030	0,025	0,022	> 2,500		66	DRB1*07/-
67	0,028	0,028	0,032	0,041	0,893	0,026	0,026	> 2,500		67	DRB1*01/DRB1*11
68	0,107	0,015	0,039	0,050	0,105	0,214	0,025	> 2,500		68	DRB1*07/DRB1*1302
70	0,024	0,028	0,846	0,058	0,952	0,028	0,024	> 2,500		70	DRB1*1401/DRB1*0101-0102
71	0,088	0,022	0,046	0,058	2,363	0,048	0,023	> 2,500		71	DRB1*11/DRB1*1301
72	0,028	0,024	0,042	0,074	0,070	0,017	0,446	> 2,500		72	DRB1*0101/DRB5*0101
73	0,024	0,023	0,030	0,135	0,045	0,018	0,424	> 2,500		73	DRB1*0101/DRB5*0101
75	0,099	0,029	0,025	0,729	0,031	0,017	0,021	> 2,500		75	DRB1*0301/DRB1*04
78	0,095	0,013	0,026	0,060	0,813	0,015	0,020	> 2,500		78	DRB1*0301/DRB1*07
79	0,117	0,028	0,034	0,744	0,912	0,019	0,019	> 2,500		79	DRB1*0301/DRB1*1301
80	0,030	0,021	0,066	0,040	0,045	0,014	0,412	> 2,500		80	DRB1*07/DRB5*0101
83	0,040	2,096	0,060	0,038	0,058	0,023	0,501	> 2,500		83	DRB1*08/DRB5*0101
84	0,152	0,021	0,049	0,041	0,011	0,210	0,019	> 2,500		84	DRB1*04/DRB1*1302
85	0,219	0,070	0,040	0,612	0,038	0,168	0,024	> 2,500		85	DRB1*03/DRB1*13
86	0,030	0,024	0,055	0,100	0,036	0,034	0,022	> 2,500		86	DRB1*04/DRB5*0201-0202
87	0,183	0,048	0,096	0,595	0,047	0,015	0,024	> 2,500		87	DRB1*1301/DRB5*0201-0202
89	0,026	0,617	0,301	0,042	0,567	0,019	0,024	> 2,500		89	DRB1*04/DRB1*12
90	0,026	0,024	0,032	0,042	0,016	0,018	0,026	> 2,500		90	DRB1*0101/DRB1*04
91	0,028	0,026	0,042	0,048	0,032	0,014	0,025	> 2,500		91	DRB1*0101/-
92	0,156	0,039	0,028	1,157	0,021	0,312	0,023	> 2,500		92	DRB1*0101/DRB1*1402
95	0,154	0,079	0,028	1,224	0,023	0,302	0,022	> 2,500		95	DRB1*1302/DRB1*1303

La méthode décrite nous permet de typer sans ambiguïté les 24 ADN testés.

5 EXEMPLE 11:

La température préférentielle d'hybridation pour le typage HLA DR décrit dans la présente invention est 37 °C.

10 Il est cependant possible de modifier cette température d'hybridation .

L'exemple suivant est identique à l'exemple 10 à l'exception de la température d'hybridation qui a été modifiée de 37°C à 45°C. Le typage est réalisé sur 11 ADN.

15 Les sondes de capture utilisées sont données dans le tableau 11 ci-après:

TABLEAU 11

reference	numéro	sequence 5'-3'
1	563	CTGGAAAGATGCA
5	603	CAGCAGGATAAGTATG
43	571B	TGGACAACTACT
9	545	GATACTTCTATCACC
10	398	CCTGATGAGGAGTA
25	14	GGCAGGGTAAGTATAAG
17	595	GGCCCTGGTGGA
44	574B	GCGGTATCTGCACA
45	556B	GGAGGAGGTTAAG
46	555B	TGGAAGACGAGC
30	48	GGAAGACAAGCG
47	756B	GCGGAGCACTGG
28	802	CCAGGAGGAGAACGT

35 Les résultats du typage sont donnés dans le tableau 12 ci-après:

TABLEAU 12

SONDE	1	5	43	9	10	14	17	44	45
OLIGO N°	563	603	571-ASB	545	398	591	595	574-ASB	556-ASB
ADN N°									
71	0,003	0,003	0,025	0,006	0,805	0,004	0,008	0,003	0,033
72	0,099	1,200	0,035	0,002	0,005	0,012	0,007	0,008	0,039
73	0,099	1,035	0,023	0,001	0,007	0,012	0,007	0,009	0,036
75	0,005	0,022	0,114	0,171	0,009	0,013	0,009	0,004	0,040
78	0,005	0,014	0,126	0,001	0,006	0,704	0,008	0,003	0,037
79	0,007	0,005	0,148	0,006	0,007	0,007	0,009	0,005	0,036
80	0,007	1,135	0,025	0,003	0,008	0,525	0,008	0,009	0,044
83	0,008	1,012	0,020	0,008	0,011	0,029	0,060	0,022	0,058
84	0,009	0,011	0,022	0,194	0,010	0,020	0,019	0,015	0,053
85	0,009	0,006	0,102	0,003	0,012	0,022	0,020	0,016	0,058
86	0,004	0,924	0,022	0,182	0,011	0,033	0,021	0,018	0,067

SONDE	46	48	47	28	TYPAGE	
OLIGO N°	555-ASB	867-ASB	756-ASB	802	controle +	
ADN N°						
71	0,583	0,016	0,009	0,039	> 2,500	DRB1*11/DRB1*1301
72	0,012	0,010	0,009	0,013	> 2,500	DRB1*0101/DRB5*0101
73	0,005	0,011	0,013	0,017	> 2,500	DRB1*0101/DRB5*0101
75	0,011	0,007	0,010	0,045	> 2,500	DRB1*0301/DRB1*04
78	0,005	0,005	0,006	0,062	> 2,500	DRB1*0301/DRB1*07
79	0,790	0,013	0,009	0,122	> 2,500	DRB1*0301/DRB1*1301
80	0,010	0,012	0,008	0,016	> 2,500	DRB1*07/DRB5*0101
83	0,029	0,021	0,021	0,040	> 2,500	DRB1*08/DRB5*0101
84	0,452	0,020	0,019	0,166	> 2,500	DRB1*04/DRB1*1302
85	0,564	0,023	0,021	0,244	> 2,500	DRB1*03/DRB1*13
86	0,017	0,017	0,020	0,038	> 2,500	DRB1*04/DRB5*0201-0202

TABLEAU 13 (SUITE)

SONDE	28	24	27	52	37	42	contrôle +		ADN N°	TYPAGE
OLIGON°	802	1066	1068	997-ASB	1033	1060				
ADN N°										
58	0,036	0,005	0,001	0,004	0,207	0,009	> 2,500		58	DRB1*0301/DRB1*07
59	0,002	0,006	0,008	0,004	0,009	0,010	> 2,500		59	DRB1*0101-0102/DRB1*07
63	0,026	0,115	0,058	0,029	0,261	0,011	> 2,500		63	DRB1*12/DRB1*1301
66	0,007	0,005	0,007	0,008	0,012	0,010	> 2,500		66	DRB1*07/-
67	0,009	0,005	0,008	0,009	0,251	0,024	> 2,500		67	DRB1*01/DRB1*11
68	0,036	0,006	0,009	0,010	0,016	0,011	> 2,500		68	DRB1*07/DRB1*1302
70	0,008	0,004	0,055	0,008	0,199	0,009	> 2,500		70	DRB1*1401/DRB1*0101-0102
71	0,034	0,003	0,005	0,009	0,539	0,008	> 2,500		71	DRB1*11/DRB1*1301
72	0,010	0,009	0,006	0,004	0,009	0,130	> 2,500		72	DRB1*0101/DRB5*0101
73	0,010	0,009	0,005	0,005	0,010	0,150	> 2,500		73	DRB1*0101/DRB5*0101
75	0,038	0,008	0,008	0,021	0,014	0,010	> 2,500		75	DRB1*0301/DRB1*04
78	0,041	0,007	0,004	0,007	0,254	0,015	> 2,500		78	DRB1*0301/DRB1*07
79	0,064	0,007	0,006	0,028	0,315	0,012	> 2,500		79	DRB1*0301/DRB1*1301
80	0,007	0,008	0,009	0,008	0,011	0,142	> 2,500		80	DRB1*07/DRB5*0101
83	0,010	0,166	0,007	0,009	0,017	0,159	> 2,500		83	DRB1*08/DRB5*0101
84	0,050	0,006	0,008	0,010	0,014	0,009	> 2,500		84	DRB1*04/DRB1*1302
85	0,063	0,009	0,007	0,036	0,009	0,011	> 2,500		85	DRB1*03/DRB1*13
86	0,014	0,008	0,004	0,011	0,010	0,010	> 2,500		86	DRB1*04/DRB5*0201-0202
87	0,042	0,007	0,005	0,028	0,007	0,004	> 2,500		87	DRB1*1301/DRB5*0201-0202
89	0,008	0,068	0,039	0,005	0,201	0,006	> 2,500		89	DRB1*04/DRB1*12
90	0,008	0,011	0,009	0,006	0,010	0,009	> 2,500		90	DRB1*0101/DRB1*04
91	0,010	0,010	0,006	0,008	0,009	0,011	> 2,500		91	DRB1*0101/-
92	0,040	0,007	0,012	0,028	0,018	0,012	> 2,500		92	DRB1*0101/DRB1*1402
95	0,035	0,008	0,009	0,030	0,017	0,009	> 2,500		95	DRB1*1302/DRB1*1303

La température préférentielle d'hybridation est 37°C et le tampon d'hybridation préférentiel est le tampon PEG, mais comme le montrent les résultats de l'exemple 11 et 12, on voit qu'il est possible de faire varier à la fois la température d'hybridation et le tampon d'hybridation.

Comme cela ressort de la description ci-avant, le procédé de la présente invention combine les avantages pratiques suivants : une spécificité optimale avec discrimination possible de tous les allèles, une simplicité d'exécution et un coût réduit par rapport à l'analyse sérologique, une rapidité d'exécution avec obtention des résultats 90 minutes environ après amplification, soit une durée totale inférieure à 12 heures, ce qui est essentiel pour les donneurs de reins, une compatibilité au typage individuel essentielle pour les typages d'urgence et l'utilisation en petits laboratoires, un signal quantifiable par mesure de Densité Optique et un traitement éventuel des résultats par un système informatique simple, et une adaptabilité à des systèmes automatiques.

#### EXEMPLE 13 :

De façon analogue à celle décrite précédemment, on a préparé des sondes de capture correspondant aux oligonucléotides désignés par les numéros de référence 101, 102, 103, 104, 115 et 111.

Ces sondes utilisées comme sonde de capture reconnaissent les spécificités indiquées dans la description.

En outre, on peut utiliser les sondes de capture de l'invention avec les sondes de détection suivantes :

-GCGGTGACGGAGCTGG

-GAACAGCCAGAAGGAC.

TABLEAU 13 (SUITE)

SONDE	28	24	27	52	37	42	controle +	ADN N°	TYPAGE
OLIGON°	802	1066	1068	997-ASB	1033	1060			
ADN N°									
58	0,036	0,005	0,001	0,004	0,207	0,009	> 2,500	58	DRB1*0301/DRB1*07
59	0,002	0,006	0,008	0,004	0,009	0,010	> 2,500	59	DRB1*0101-0102/DRB1*07
63	0,026	0,115	0,058	0,029	0,261	0,011	> 2,500	63	DRB1*12/DRB1*1301
66	0,007	0,005	0,007	0,008	0,012	0,010	> 2,500	66	DRB1*07/-
67	0,009	0,005	0,008	0,009	0,251	0,024	> 2,500	67	DRB1*01/DRB1*11
68	0,036	0,006	0,009	0,010	0,016	0,011	> 2,500	68	DRB1*07/DRB1*1302
70	0,008	0,004	0,055	0,008	0,199	0,009	> 2,500	70	DRB1*1401/DRB1*0101-0102
71	0,034	0,003	0,005	0,009	0,539	0,008	> 2,500	71	DRB1*11/DRB1*1301
72	0,010	0,009	0,006	0,004	0,009	0,130	> 2,500	72	DRB1*0101/DRB5*0101
73	0,010	0,009	0,005	0,005	0,010	0,150	> 2,500	73	DRB1*0101/DRB5*0101
75	0,038	0,008	0,008	0,021	0,014	0,010	> 2,500	75	DRB1*0301/DRB1*04
78	0,041	0,007	0,004	0,007	0,254	0,015	> 2,500	78	DRB1*0301/DRB1*07
79	0,064	0,007	0,006	0,028	0,315	0,012	> 2,500	79	DRB1*0301/DRB1*1301
80	0,007	0,008	0,009	0,008	0,011	0,142	> 2,500	80	DRB1*07/DRB5*0101
83	0,010	0,166	0,007	0,009	0,017	0,159	> 2,500	83	DRB1*08/DRB5*0101
84	0,050	0,006	0,008	0,010	0,014	0,009	> 2,500	84	DRB1*04/DRB1*1302
85	0,063	0,009	0,007	0,036	0,009	0,011	> 2,500	85	DRB1*03/DRB1*13
86	0,014	0,008	0,004	0,011	0,010	0,010	> 2,500	86	DRB1*04/DRB5*0201-0202
87	0,042	0,007	0,005	0,028	0,007	0,004	> 2,500	87	DRB1*1301/DRB5*0201-0202
89	0,008	0,068	0,039	0,005	0,201	0,006	> 2,500	89	DRB1*04/DRB1*12
90	0,008	0,011	0,009	0,006	0,010	0,009	> 2,500	90	DRB1*0101/DRB1*04
91	0,010	0,010	0,006	0,008	0,009	0,011	> 2,500	91	DRB1*0101/-
92	0,040	0,007	0,012	0,028	0,018	0,012	> 2,500	92	DRB1*0101/DRB1*1402
95	0,035	0,008	0,009	0,030	0,017	0,009	> 2,500	95	DRB1*1302/DRB1*1303

La température préférentielle d'hybridation est 37°C et le tampon d'hybridation préférentiel est le tampon PEG, mais comme le montrent les résultats de l'exemple 11 et 12, on voit qu'il est possible de faire varier à la fois la température d'hybridation et le tampon d'hybridation.

Comme cela ressort de la description ci-avant, le procédé de la présente invention combine les avantages pratiques suivants : une spécificité optimale avec discrimination possible de tous les allèles, une simplicité d'exécution et un coût réduit par rapport à l'analyse sérologique, une rapidité d'exécution avec obtention des résultats 90 minutes environ après amplification, soit une durée totale inférieure à 12 heures, ce qui est essentiel pour les donneurs de reins, une compatibilité au typage individuel essentielle pour les typages d'urgence et l'utilisation en petits laboratoires, un signal quantifiable par mesure de Densité Optique et un traitement éventuel des résultats par un système informatique simple, et une adaptabilité à des systèmes automatiques.

#### EXEMPLE 13 :

De façon analogue à celle décrite précédemment, on a préparé des sondes de capture correspondant aux oligonucléotides désignés par les numéros de référence 101, 102, 103, 104, 115 et 111.

Ces sondes utilisées comme sonde de capture reconnaissent les spécificités indiquées dans la description.

En outre, on peut utiliser les sondes de capture de l'invention avec les sondes de détection suivantes :

-GCGGTGACGGAGCTGG

-GAACAGCCAGAAGGAC.



REVENDEICATIONS

1. Sonde nucléotidique choisie parmi les suivantes :

- TGGCAGCTTAAGTTT
- CCTAAGAGGGAGTG
- GCGAGTGTGGAACCT
- AAGACAGGCGGGC,

ou leurs complémentaires.

2. Ensemble de sondes oligonucléotidiques permettant d'effectuer le typage HLA DR, comprenant au moins une sonde choisie parmi :

- TGGCAGCTTAAGTTT
- CCTAAGAGGGAGTG
- GCGAGTGTGGAACCT
- AAGACAGGCGGGC,

ou leurs complémentaires.

3. Ensemble de sondes selon la revendication 2, contenant en outre au moins une sonde choisie parmi :

- GTGGACAACTACTG - GATACTTCTATCACAA - GCCTGATGAGGAGTAC
- TGGCAGGGTAAGTATAAG - GGGCCCTGGTGGACA - TGCGGTATCTGCACA
- GGAGGAGGTTAAGTT - CTGGAAGACGAGCG - TGGAAGACAAGCGG
- TGCGGAGCACTGGA - AACCAGGAGGAGAACGTG - ACTCTACGGGTGAGTG
- GACACCTATTGCAGAC,

la partie soulignée correspondant à une séquence minimum,

ou leurs complémentaires.

4. Ensemble de sondes selon la revendication 3, contenant au moins une sonde choisie parmi :

- TGGACAACTACT - GATACTTCTATCACC - CCTGATGAGGAGTA
- GGCAGGGTAAGTATAAG - GGCCCTGGTGGGA - GCGGTATCTGCACA
- GGAGGAGGTTAAGTT - TGGAAGACGAGC - GGAAGACAAGCG
- GCGGAGCACTGG - AACCAGGAGGAGAACGT - CTCTACGGGTGAGT
- ACACCTATTGCAGA,

ou leurs complémentaires.

5. Ensemble de sondes selon l'une quelconque des revendications 2 et 3, contenant en outre au moins une sonde choisie parmi

- GAGGAGGACTTGCGCT - TACGGGGCTGTGGAG - GGAGCTGCGTAAGT
- TTCCTGGAGAGACAC - GGGAGAGATACTTCC,

ou leurs complémentaires.

6. Ensemble de sondes selon la revendication 5, contenant au moins une sonde choisie parmi :

- AGGAGGACTTGCGC - ACGGGGCTGTGGA - GAGCTGCGTAAG
- TTCCTGGAGAGACAC - GGAGAGATACTTC,

5 ou leurs complémentaires.

7. Ensemble de sondes selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, contenant la sonde :

- AACCAGIAGGAGAACGT,

ou sa complémentaire.

10 8. Ensemble de sondes selon l'une quelconques des revendications 2 à 7, contenant en outre au moins une des sondes suivantes :

- GCGGTGACGGAGCTGG
- GAACAGCCAGAAGGAC
- CCGGGCGGTGACIGAGCTGGGGC,

15 ou leurs complémentaires.

9. Procédé pour déterminer le typage HLA DR d'un individu à partir d'un échantillon de l'individu selon les techniques usuelles de typage par oligonucléotides, caractérisé par le fait qu'on utilise, comme sondes de capture ou de détection, au moins une partie des sondes de l'ensemble de sondes défini dans l'une quelconque des revendications 2 à 8.

20 10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par le fait que lesdites sondes sont choisies parmi celles mentionnées dans l'une quelconque des revendications 2 à 7.

25 11. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait que l'on utilise lesdites sondes comme sondes de capture.

12. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes consistant à :

- immobiliser chaque sonde de capture sur un support solide,
- mettre en contact chaque sonde de capture immobilisée avec un milieu liquide contenant au moins un fragment d'acide nucléique cible, dans des conditions prédéterminées permettant l'hybridation si la séquence complémentaire de celle de la sonde est présente dans la cible, et
- détecter la présence d'hybrides éventuellement formés.

35 13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé par le fait que l'étape consistant à mettre en contact chaque sonde de capture immobilisée avec un milieu liquide contenant au moins un fragment d'acide nucléique cible est effectué à une température de 37° C.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR 96/00836

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,92 10589 (HOFFMANN LA ROCHE) 25 June 1992	1,2,9-12
Y	see the whole document ---	3-8,13
X	WO,A,93 09245 (UNIV PITTSBURGH) 13 May 1993	1,2,9-12
Y	see the whole document ---	3-8,13
X	WO,A,92 08117 (APPLIED BIOSYSTEMS) 14 May 1992	1,2,9-12
Y	see the whole document ---	3-8,13
X	WO,A,92 12996 (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 6 August 1992 see the whole document ---	1,2
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 November 1996

Date of mailing of the international search report

22. 11. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hagenmaier, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/00836

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 459 532 (CETUS CORP) 4 December 1991	1,2,9-12
Y	see the whole document ---	3-8,13
Y	FR,A,2 679 252 (BIO MERIEUX) 22 January 1993 see the whole document ---	3-8,13
A	EP,A,0 472 399 (MITSUI PETROCHEMICAL IND ;KITASATO INST (JP)) 26 February 1992 see the whole document -----	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 96/00836

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO-A-9210589	25-06-92	AU-B-	656161	27-01-95
		AU-A-	9136191	08-07-92
		CA-A-	2075037	07-06-92
		EP-A-	0514534	25-11-92
		JP-T-	6505625	30-06-94
		US-A-	5567809	22-10-96
-----				
WO-A-9309245	13-05-93	EP-A-	0656065	07-06-95
		JP-T-	7500734	26-01-95
-----				
WO-A-9208117	14-05-92	NL-A-	9002259	18-05-92
		EP-A-	0553247	04-08-93
-----				
WO-A-9212996	06-08-92	AU-A-	1271692	27-08-92
		CA-A-	2101065	23-07-92
		EP-A-	0568623	10-11-93
		EP-A-	0722738	24-07-96
		JP-T-	6507384	25-08-94
-----				
EP-A-0459532	04-12-91	EP-A-	0459533	04-12-91
		AT-T-	125307	15-08-95
		AU-B-	594130	01-03-90
		AU-A-	6996287	17-09-87
		CA-A-	1284931	18-06-91
		DE-D-	3751423	24-08-95
		DE-T-	3751423	14-12-95
		DE-D-	3777213	16-04-92
		EP-A-	0237362	16-09-87
		HK-A-	145894	30-12-94
		JP-A-	7313197	05-12-95
		JP-A-	62214355	21-09-87
		SG-A-	132994	13-01-95
		US-A-	5567809	22-10-96
		US-A-	5541065	30-07-96
		US-A-	5468613	21-11-95
		US-A-	5310893	10-05-94
-----				
FR-A-2679252	22-01-93	AU-B-	659866	01-06-95
		AU-A-	2388592	23-02-93
		CA-A-	2091775	18-01-93

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Publication No

PCT/FR 96/00836

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2679252		EP-A- 0549776	07-07-93
		WO-A- 9302213	04-02-93
		JP-T- 6501622	24-02-94
-----			
EP-A-0472399	26-02-92	CA-A- 2049449	21-02-92
		JP-A- 5276954	26-10-93
		JP-A- 8205899	13-08-96
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 96/00836

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,92 10589 (HOFFMANN LA ROCHE) 25 Juin 1992	1,2,9-12
Y	voir le document en entier ---	3-8,13
X	WO,A,93 09245 (UNIV PITTSBURGH) 13 Mai 1993	1,2,9-12
Y	voir le document en entier ---	3-8,13
X	WO,A,92 08117 (APPLIED BIOSYSTEMS) 14 Mai 1992	1,2,9-12
Y	voir le document en entier ---	3-8,13
X	WO,A,92 12996 (IMMUNE RESPONSE CORP INC) 6 Août 1992 voir le document en entier ---	1,2
	-/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 Novembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22. 11. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hagenmaier, S

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No  
PCT/FR 96/00836

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 459 532 (CETUS CORP) 4 Décembre 1991	1,2,9-12
Y	voir le document en entier ---	3-8,13
Y	FR,A,2 679 252 (BIO MERIEUX) 22 Janvier 1993 voir le document en entier ---	3-8,13
A	EP,A,0 472 399 (MITSUI PETROCHEMICAL IND ;KITASATO INST (JP)) 26 Février 1992 voir le document en entier -----	1-13



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membranes de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 96/00836

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9210589	25-06-92	AU-B- 656161	27-01-95
		AU-A- 9136191	08-07-92
		CA-A- 2075037	07-06-92
		EP-A- 0514534	25-11-92
		JP-T- 6505625	30-06-94
		US-A- 5567809	22-10-96
-----			
WO-A-9309245	13-05-93	EP-A- 0656065	07-06-95
		JP-T- 7500734	26-01-95
-----			
WO-A-9208117	14-05-92	NL-A- 9002259	18-05-92
		EP-A- 0553247	04-08-93
-----			
WO-A-9212996	06-08-92	AU-A- 1271692	27-08-92
		CA-A- 2101065	23-07-92
		EP-A- 0568623	10-11-93
		EP-A- 0722738	24-07-96
		JP-T- 6507384	25-08-94
-----			
EP-A-0459532	04-12-91	EP-A- 0459533	04-12-91
		AT-T- 125307	15-08-95
		AU-B- 594130	01-03-90
		AU-A- 6996287	17-09-87
		CA-A- 1284931	18-06-91
		DE-D- 3751423	24-08-95
		DE-T- 3751423	14-12-95
		DE-D- 3777213	16-04-92
		EP-A- 0237362	16-09-87
		HK-A- 145894	30-12-94
		JP-A- 7313197	05-12-95
		JP-A- 62214355	21-09-87
		SG-A- 132994	13-01-95
		US-A- 5567809	22-10-96
		US-A- 5541065	30-07-96
		US-A- 5468613	21-11-95
		US-A- 5310893	10-05-94
-----			
FR-A-2679252	22-01-93	AU-B- 659866	01-06-95
		AU-A- 2388592	23-02-93
		CA-A- 2091775	18-01-93

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No  
PCT/FR 96/00836

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A-2679252		EP-A- 0549776	07-07-93
		WO-A- 9302213	04-02-93
		JP-T- 6501622	24-02-94
-----			
EP-A-0472399	26-02-92	CA-A- 2049449	21-02-92
		JP-A- 5276954	26-10-93
		JP-A- 8205899	13-08-96
-----			